

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

О. С. Синицына¹, И. М. Рыженко², А. В. Зайченко³, Ю. Б. Ларьяновская⁴

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ВАГИНАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ НА СОСТОЯНИЕ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ САМОК КРЫС

¹Институт повышения квалификации специалистов фармации Национального фармацевтического университета, г. Харьков, Украина

²Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

³Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина

⁴Центральная научно-исследовательская лаборатория Национального фармацевтического университета, г. Харьков, Украина

Установлена эффективность действия новых вагинальных гелей, содержащих в своем составе глюкозамина гидрохлорид (тест-образец № 1) и экстракт хмеля (тест-образец № 2) на состояние генитального тракта овариэктомированных самок крыс. Лечебный эффект исследуемых вагинальных гелей и препарата сравнения – суппозиториев «Овестин» оценивали на основании микробиологического исследования вагинального секрета, определения показателя pH вагинальной среды, морфологического изучения тканей вагины и матки овариэктомированных крыс. Показано, что курсовое введение животным тест-образца № 1 оказывало позитивное влияние на исследуемые показатели, а тест-образец № 2 проявлял большую активность по сравнению с ним. По способности увеличивать популяцию лактобактерий тест-образец № 2 превышал активность препарата сравнения. Исследуемые тест-образцы являются перспективными для дальнейшего изучения с целью использования их в комбинации с другими лекарственными средствами для проведения менопаузальной гормональной терапии у женщин с эстрогеновым дефицитом и в период менопаузы.

Ключевые слова: овариэктомированные самки крыс, дефицит эстрогенов, генитальный тракт, фитоэстрогены, вагинальный гель с экстрактом хмеля, вагинальный крем-гель с глюкозамина гидрохлоридом.

ВВЕДЕНИЕ

Урогенитальные менопаузальные расстройства – это совокупность симптомов нарушенной функции генитального и мочевыводящего трактов, вагины в условиях гипоестрогении [1]. Ткани этих органов являются эстрогензависимыми: в клетках вагинального эпителия присутствуют эстрогеновые рецепторы α , а в гладкой мускулатуре вагинальных – преимущественно эстрогеновые рецепторы β [2]. Урогенитальные менопаузальные расстройства отмечаются у 10% женщин в период перименопаузы, в 55–60 лет их частота достигает 50%, а после 75 лет страдают практически все женщины. Ощущение сухости влагалища является первым симптомом, который зарегистрирован в период перименопаузы [3]. Снижение кровообращения во

влагалище, прекращение пролиферативных процессов в эпителии и уменьшение количества эпителиальных клеток, а также трассудации на фоне гипоестрогении в климактерии способствуют развитию атрофических и дистрофических процессов во влагалище с симптомами сухости, зуда, диспареунии [4, 5].

Риск развития инфекции мочеполовых путей значительно усиливается у женщин за счет нарушения функционирования защитного механизма уретры, а именно десквамации клеток ее наружного слоя, где происходит адгезия патогенных микроорганизмов. В условиях гипоестрогении уропатогенные микроорганизмы прикрепляются к клеткам базального и парабазального слоев с вероятной последующей манифестацией болезни [6]. По данным зарубежных авторов, в постменопаузаль-

ном периоде 10–15% женщин страдают от рецидивов инфекций мочевыводящих путей, а у 20% женщин обнаруживали бактериурию [7].

Влагалище, вагинальная микрофлора и вагинальная среда, контролирующая микрофлору, образуют гармоничную, но весьма динамичную экосистему [8]. Известно, что pH вагинального секрета и количество лактобактерий меняются на протяжении всей жизни. Для лактобацилл гликоген является важнейшим источником энергии, они способны метаболизировать его с образованием молочной кислоты и ионов водорода [9], тем самым снижая pH вагинального секрета и ингибируя рост других микроорганизмов [10, 11]. Доминантную позицию лактобактерии сохраняют на протяжении всего репродуктивного периода женщины [12]. У женщин репродуктивного возраста на содержание гликогена и его ферментацию оказывает влияние гормональный статус в различные фазы менструального цикла. Большое количество гликогена в вагинальном эпителии – это результат влияния циркулирующих эстрогенов. Максимальное накопление гликогена приходится на момент овуляции [13]. В постменопаузальном периоде на фоне сниженного продуцирования эстрогенов и истончения слоев промежуточных и наружных клеток вагины снижается содержание гликогена, окислительного потенциала, уменьшается количество факультативных лактобактерий, увеличивается количество анаэробных лактобацилл, которые продуцируют меньшее количество водорода (H_2O_2) с прямым токсическим действием на патогенную микрофлору. Таким образом, увеличивается пул облигатно-аэробных микроорганизмов, развивается вагинальный дисбиоз, повышаются показатели pH [14, 15]. По мере увеличения pH растет и количество условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Gardnerella vaginalis* и *Mobiluncus*, при pH 5,7 появляются *Clostridium sordellii*, при pH 6,5 – бактерии вида *Enterobacteriaceae*, при pH 8,0 – *Peptostreptococcus*. Наличие избыточного количества анаэробных условно-патогенных микроорганизмов в совокупности с минимальным количеством или отсутствием лактобактерий характеризуют как общий невоспалительный синдром – бактериальный дисбиоз. Уменьшение резистентности эпителиальных клеток, а также

индукция локальной иммуновоспалительной реакции клинически проявляются вагинитом. Считается, что совокупность сниженного титра лактобацилл и присутствие парабазальных клеток являются признаком прогрессирующего процесса атрофии слизистой оболочки вагины вследствие гипострогении (редукция сосудистой сетки во влагалище, усиленная гипоксия тканей, что приводит к образованию язв, атрофии тела и шейки матки) [11].

Фармакологическая коррекция патологических проявлений климакса проводится препаратами эстрогенов, комбинированными средствами, содержащими эстрогены с прогестинами, фитоэстрогенами. При несомненной эффективности гормональных лекарственных средств они имеют целый ряд противопоказаний, ограничивающих их применение. Большинство женщин вследствие недостаточной осведомленности о современных фармакотерапевтических возможностях, «гормонофобии» или при наличии факторов риска и противопоказаний к половым стероидам более благосклонны к использованию негормональных средств коррекции менопаузальных генитальных расстройств: как системных (фитоэстрогены), так и средств для местного применения (лубриканты, увлажняющие средства с фитоэстрогенами) [16]. Преимуществом топикальных лекарственных форм является устранение патологической симптоматики гипострогении и быстрое купирование генитальных расстройств.

Пренилфлавоноиды хмеля, в том числе 8-пренилнارينгенин (8-PN), проявляют наиболее высокую эстрогеноподобную активность и способны предупреждать большинство последствий гипострогенового состояния организма. Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) содержит большое количество 8-PN и изоксантохумола [17], который является предшественником синтеза 8-PN. Биологически активным веществам хмеля присущи такие виды фармакологической активности: эстрогеноподобная, седативная, антипролиферативная, репаративная, противовоспалительная, антиоксидантная, спазмолитическая, противоопухолевая, антимикробная, в том числе антигерпетическая [18].

Гликозаминогликаны (ГАГ), в частности гиалуроновая кислота, имеют важное значение в регуляции репродуктивной

функции женского организма. Это гетерополимеры гексуроновых кислот (глюкуроновой, идуроновой) с аминасахарами (глюкозамин, галактозамин). Глюкозамин, его активный метаболит гиалуроновая кислота и ее соли, также другие ГАГ, в состав которых он входит, обеспечивают разнообразные физиологические свойства экстрацеллюлярного матрикса женского репродуктивного тракта, в том числе реологические свойства вагинальной и цервикальной слизи и могут влиять на состояние вагинального микробиоценоза [16, 19].

В странах Евросоюза и США зарегистрированы и широко используются для лечения менопаузальных генитоуринарных расстройств топикальные лекарственные препараты, содержащие экстракт хмеля и гиалуроновую кислоту (Rosaltrof, Gynatrof, Gynomunal), тогда как в Украине аналоги по составу и показаниям к применению отсутствуют. Лекарственные препараты, содержащие глюкозамина гидрохлорид в составе вагинальных лекарственных форм, до настоящего времени не изучались. Таким образом, разработка и фармакологическое изучение новых топикальных лекарственных форм на основе фитоэстрогенов (экстракт шишек хмеля) и глюкозамина для коррекции генитоуринарных расстройств при патологическом или физиологическом дефиците эстрогенов являются актуальной задачей современной медицины и фармации.

Целью нашего исследования было фармакологическое изучение влияния новых вагинальных гелей на вагинальный биотоп, показатель pH вагинального секрета, микроскопическую организацию вагины и матки овариэктомированных самок крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на 36 белых нелинейных самках крыс, которых содержали в стандартных условиях вивария Национального фармацевтического университета на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде.

Животные были разделены на 5 групп: интактный контроль (ИК); контрольная патология – овариэктомированные крысы (КП); овариэктомированные крысы, леченные вагинальным гелем с 5% глюкозамина гидрохлоридом (тест-образец № 1);

овариэктомированные крысы, леченные вагинальным гелем с экстрактом хмеля и аскорбиновой кислотой (тест-образец № 2); овариэктомированные животные, которым вводили препарат сравнения – вагинальные суппозитории «Овестин» (производства компании Органон, Нидерланды), действующее вещество – эстриол (Э).

В состав тест-образца № 1 входил аминасахар глюкозамина гидрохлорид, участвующий в процессах женской репродукции и регуляции гормонального гомеостаза женского организма [20, 21], а также крем-гелевая основа, которая придает лекарственной форме биоадгезивные свойства. Данный тест-образец был разработан под руководством профессора, д. фарм. н. Н. А. Ляпунова на базе научно-технологического комплекса «Институт монокристаллов» НАН Украины.

Исследуемый тест-образец № 2 комбинированного состава, в качестве основного действующего вещества содержащий экстракт хмеля, а также аскорбиновую кислоту и вспомогательные вещества, разработан на кафедре аптечной технологии лекарств им. Д. П. Сало НФаУ под руководством профессора Л. И. Вишневской.

На 35-й день после кастрации самкам интравагинально вводили препараты на протяжении 28-и дней (ежедневно в 9:00): исследуемый тест-образец № 1 в дозе 22,7 мг/кг (в пересчете на глюкозамина гидрохлорид), тест-образец № 2 в дозе 0,06 мг/кг (в пересчете на фитоэстрогены), препарат сравнения – 0,03 мг/кг (в пересчете на эстриол).

Оценку эффективности лечебного действия исследуемых тест-образцов и вагинальных суппозиторий с Э на состояние генитального тракта проводили на основании изучения количества лактобактерий в посеве вагинального секрета, показателя кислотности (pH) вагинального секрета, морфологического исследования матки и вагины экспериментальных животных.

Моделирование у животных гипозстрогенового состояния, близкого к такому у женщин в период менопаузы, воспроизводили путем билатеральной овариэктомии самок по Киршенблату Я. Д. [22].

Интравагинальное введение тест-образцов осуществляли с помощью специального аппликатора раз в сутки, во временном интервале 9:00–10:00 часов. Суппозитории «Овестин» дополнительно рас-

плавляли на водяной бане (t 37–37,5°C).

Терапевтическую дозу препарата сравнения рассчитывали, используя коэффициент видовой чувствительности [23]. Коррекцию доз исследуемых препаратов проводили с учетом изменений массы тела самок крыс в течение всего эксперимента.

Микробиологическое исследование вагинального биотопа проводили по классической схеме определения потенциального дисбиотического действия лекарственных препаратов в разные сроки: до начала лечения и после его завершения [24]. Отбор биологического материала для изучения осуществляли стерильными тампонами, которые вносили в стерильные пробирки с тиогликолевым буферным раствором. Последующее разведение (от 10^{-2} до 10^{-10}) проводили тем же буфером с использованием новой пипетки для каждого разведения. Полученные растворы наносили по 0,1 мл капельно (методом прямого посева) на лактоагар.

Водородный показатель (pH) вагинальной среды измеряли дважды: за 24 часа до начала введения исследуемых препаратов и через 24 часа после последнего введения тест-образцов для исключения влияния кислотности лекарственной формы на этот показатель. Показатель pH вагинальных смывов определяли с помощью pH-тестов Citolab (DFI Co, Ltd, Корея).

Для морфологического изучения слизистой оболочки вагины, рогов матки образцы тканей фиксировали в 10% растворе формалина, обезжизивали в спиртах восходящей концентрации, заливали в целлоидин-парафин и делали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином [25]. Микропрепараты просматривали с использованием микроскопа Granum, микрофотографирование изображений осуществляли цифровой видеокамерой GranumДСМ310. Фотографии обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы TourView.

Статистическую обработку цифровых показателей проводили по Стьюденту с вычислением среднеарифметических значений и среднеквадратических ошибок с применением программного пакета Microsoft Excel XP. Значение рядов и их среднеквадратичные ошибки сравнивали между собой с определением коэффициента Стьюдента или Ньюмена-Кейлса – в случае нормального распределения, непараметрического критерия Крускала-Уол-

лиса, Фишера – для данных, которые не подчиняются нормальному закону распределения [26, 27]. Отличия между группами считали статистически достоверными при принятом уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Исследования проводили с соблюдением правил «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986 г.) [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вагинальный биотоп – это среда обитания эндогенной микрофлоры, которая характеризуется однородными условиями существования. Показано, что после билатеральной овариэктомии в посевах вагинального секрета статистически достоверно увеличивалось количество условно-патогенных микроорганизмов, аэробных грамотрицательных бактерий в 1,3 раза, количество колоний кишечных палочек в 1,4 раза, стафилококков в 1,6 раза, появились клостридии (таблица 1). Установлено достоверное снижение количества лактобактерий в 1,2 раза, которое трактовали как вагинальный дисбиоз. Все эти изменения указывали на существенные изменения вагинального биоценоза.

Изменения вагинального микробного пейзажа у самок крыс после использования препарата для менопаузальной заместительной терапии – суппозиториев с Э – проявлялось достоверным уменьшением условно-патогенных микроорганизмов, общего количества анаэробов, кишечной палочки, стафилококков, клостридий и выраженной колонизацией лактобактериями.

Под влиянием тест-образца № 1 наблюдалось умеренное улучшение исследуемых показателей вагинального биотопа: уменьшение роста условно-патогенных микроорганизмов, повышение колонизации лактобактерий и незначительное влияние на количество клостридий. Таким образом, способность исследуемого кремгеля влиять на состояние вагинального пейзажа, проявления инфекционно-воспалительного процесса в генитальном тракте можно пояснить данными Yasunaga Y. и соавт. (2012) об экспрессии аминокислот на поверхности клеток вагинального эпителия [29].

Таблица 1. – Показатели состояния биоценоза нижнего отдела генитального тракта самок крыс разных экспериментальных групп (КОЕ/мл, $\bar{x} \pm S_x$)

Микроорганизмы	Экспериментальные группы, n = 6							
	ИК	КП	Овариэктомированные самки, получавшие препарат сравнения		Овариэктомированные самки, получавшие тест-образец № 1		Овариэктомированные самки, получавшие тест-образец № 2	
			до леч.	после леч.	до леч.	после леч.	до леч.	после леч.
Анаэробные бактерии	9,03± 0,10	9,63± 0,06 ¹⁾	9,33± 0,06 ¹⁾²⁾	9,04± 0,06 ²⁾³⁾	9,61± 0,07 ¹⁾⁴⁾	9,12± 0,10 ¹⁾²⁾³⁾	9,86± 0,04 ¹⁾²⁾⁴⁾	9,44± 0,08 ¹⁾³⁾⁴⁾
Клостридии	–	6,62± 0,07 ¹⁾	6,12± 0,08 ¹⁾²⁾	5,01± 0,04 ¹⁾²⁾³⁾	6,62± 0,08 ¹⁾³⁾⁴⁾	5,44± 0,10 ¹⁾²⁾⁴⁾	5,82± 0,07 ¹⁾²⁾	–
Кишечная палочка	6,68± 0,07	9,44± 0,10 ¹⁾	9,53± 0,08 ¹⁾	8,12± 0,12 ²⁾³⁾	9,36± 0,08 ¹⁾	8,12± 0,05 ¹⁾²⁾³⁾	8,92± 0,12 ¹⁾²⁾	6,75± 0,04 ²⁾³⁾⁴⁾
Другие аэробные грамотрицательные бактерии	6,10± 0,08	8,01± 0,03 ¹⁾	7,76± 0,06 ¹⁾²⁾	7,63± 0,06 ¹⁾²⁾	7,98± 0,10 ¹⁾	6,64± 0,04 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	7,90± 0,10 ¹⁾	5,28± 0,07 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
Стафилококки	3,08± 0,09	5,08± 0,07 ¹⁾	5,11± 0,07 ¹⁾	4,20± 0,03 ²⁾³⁾	4,98± 0,08 ¹⁾	4,12± 0,03 ¹⁾²⁾³⁾	5,11± 0,07 ¹⁾	3,16± 0,12 ²⁾³⁾⁴⁾
Лактобактерии	9,76± 0,04	8,85± 0,07 ¹⁾	8,00± 0,01 ¹⁾²⁾	9,01± 0,08 ¹⁾³⁾	8,76± 0,08 ¹⁾	9,11± 0,12 ¹⁾³⁾	8,90± 0,12 ¹⁾	9,87± 0,08 ²⁾³⁾⁴⁾

Примечания: ¹⁾ достоверно по отношению к группе животных интактного контроля, $p < 0,05$; ²⁾ достоверно по отношению к группе животных контрольной патологии, $p < 0,05$; ³⁾ достоверно по отношению к этой же группе животных до лечения, $p < 0,05$; ⁴⁾ достоверно по отношению к группе животных, получавших препарат сравнения, $p < 0,05$. (n – количество животных в экспериментальной группе).

У овариэктомированных самок, которым вводили тест-образец № 2, наблюдалась такая же тенденция изменения показателей биоценоза, как у самок, которые получали препарат сравнения. Так, количество условно-патогенных микроорганизмов и общее количество анаэробов статистически достоверно уменьшалось, а количество лактобактерий было на уровне группы животных ИК. В то же время не было обнаружено колоний клостридий.

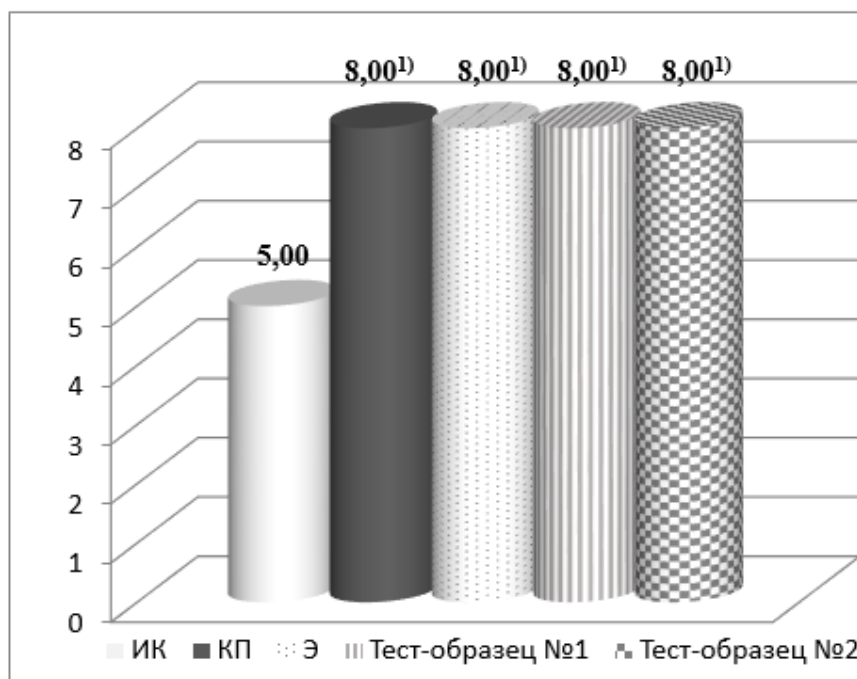
Полученные результаты свидетельствуют о том, что лечение суппозиториями с Э нормализовало вагинальный микробиоценоз самок крыс с гипострогией, а исследуемые тест-образцы в целом проявляли менее выраженную активность. Однако по влиянию на показатели количества аэробных грамотрицательных бактерий, стафилококков и способности восстанавливать численность лактобактерий активность тест-образца № 2 превосходила препарат сравнения.

Кислая среда вагинального секрета является универсальным маркером нормального гормонального статуса и состояния

биоценоза генитального тракта [9]. В период постменопаузы, при выраженном дефиците эстрогенов, из трансудата слизистой оболочки вагины исчезает гликоген, а из вагинального секрета элиминирует основной компонент, который поддерживает микробиоценоз, – лакто- и бифидобактерии. Все это приводит к увеличению показателя pH вагинального секрета и усилению симптомов атрофического вагинита [30, 31]. В связи с этим изучалось влияние исследуемых тест-образцов на показатель pH вагинального секрета у самок крыс с гипострогией. Овариэктомированные самки были разделены на три группы, между которыми перед началом лечения не было отмечено различий в показателях кислотности. При измерении pH вагинальных смывов через 5 недель после проведенной операции (до начала лечения) установлено, что у крыс показатель pH увеличился с 5,0 до 8,0, т.е. кислотность вагинального секрета уменьшалась (рисунок 1). Полученные результаты, а также исследования вагинального биоценоза (в частности уменьшение количества лак-

тобактерий) согласуются с данными литературы о том, что вследствие гипофункции яичников уменьшается синтез эстрогенов, которые стимулируют пролиферацию многослойного эпителия и увеличивают содержание гликогена в наружных клетках эпителия. Гликоген отшелушенных клеток эпителия является субстратом для жизнедеятельности лактобактерий, ферменты которых образуют молочную кислоту с

освобождением ионов водорода, что является основным механизмом формирования кислотности вагинальной среды [9, 32–34]. Кроме этого, эстрогены (в частности и фитоэстрогены) способны регулировать транспорт водорода между НАДФ⁺H и НАД, что приводит к увеличению содержания НАДФ-акцептора водорода в органах генитального тракта, способствующее регуляции pH, в том числе и в вагине [35].



¹⁾ достоверно по отношению к группе животных интактного контроля, $p < 0,05$.

Рисунок 1. – Исходные значения pH вагинального секрета за 24 часа до лечения у интактных, овариэктомированных животных групп: контрольной патологии; препарата сравнения – суппозитория с эстриолом; тест-образца № 1, тест-образца № 2

После окончания курса лечения кислотность вагинального секрета измеряли второй раз. Установлено, что величина pH секрета в группах самок с сохраненными и удаленными яичниками не изменилась, осталась на отметках 5,0 и 8,0 соответственно (рисунок 2).

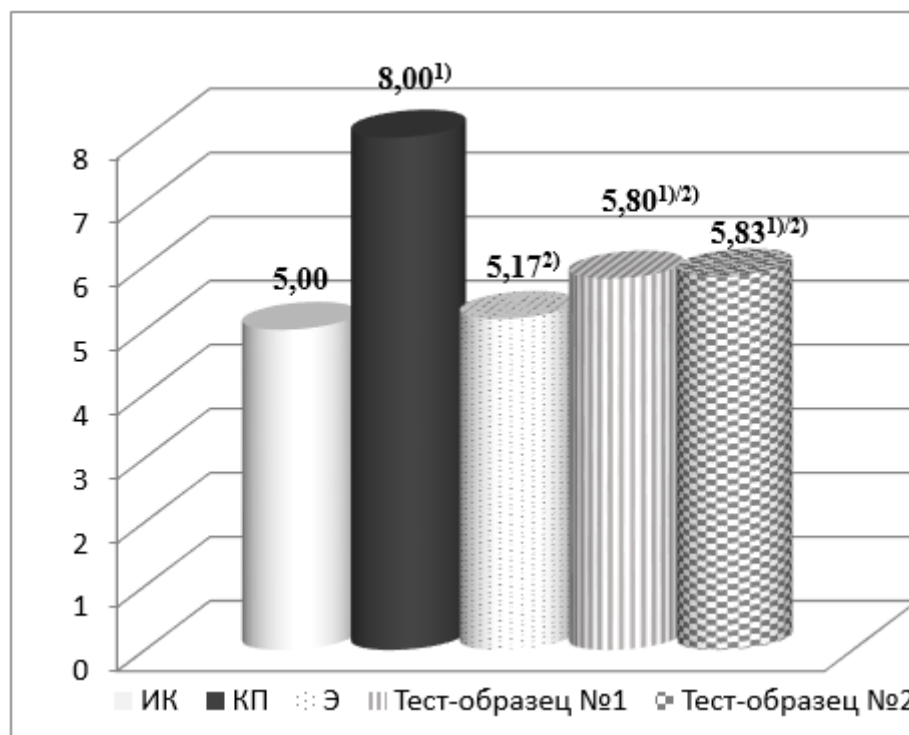
После лечения самок крыс препаратом сравнения наблюдалась полноценная нормализация pH вагинального секрета и этот показатель соответствовал данным группы ИК. Известно, что позитивный эффект при заместительной гормональной терапии (ЗГТ) сохраняется не продолжительное время. В совокупности с нежеланием женщин использовать эстриол более двух недель снижается эффективность лечения

симптома вагинального алкалоза при гипозестрогении [34].

Использование тест-образца № 1 позитивно влияло на кислотность вагинального секрета, среднее значение pH уменьшалось в 1,4 раза ($p < 0,05$) относительно данных у самок группы КП, но все-таки не достигало значений ИК. По влиянию на показатель pH вагинального секрета тест-образец № 1 незначительно уступал суппозиториям с Э. Несмотря на то, что глюкозамин не влияет на этиологический компонент менопаузального синдрома, а также не является препаратом для ЗГТ при дефиците эстрогенов, он может нивелировать симптомы алкалоза вагинального секрета за счет воз-

действия на вторичные факторы, которые активизируются после гормонального сбоя и влияют на pH среды больше, чем гормональные колебания. Такими факторами являются лейкоцитоз как послед-

ствия нарушения местного иммунитета и нарушения нормоценоза вагины (уменьшение количества *Lactobacillus spp.*, увеличение количества вирулентных штаммов бактерий или грибов) [36].



¹⁾ достоверно по отношению к группе животных интактного контроля, $p < 0,05$;

²⁾ достоверно по отношению к группе животных контрольной патологии, $p < 0,05$.

Рисунок 2. – Значения pH вагинального секрета овариэктомированных самок крыс после курса лечения исследуемыми тест-образцами и препаратом сравнения

На рисунке 2 видно, что после курсового лечения тест-образцами № 1 и № 2 pH вагинального секрета животных достигал одинаковых значений (5,80 и 5,83 соответственно). Поскольку сродство фитоэстрогенов к эстрогеновым рецепторам зависит от вида рецептора и оно меньше, чем у эстрогенов, а уровень их участия в окислительно-восстановительных процессах в гормончувствительных клетках слабее, то и ожидаемый эффект от лечения тест-образцом № 2 был несколько меньшим, чем у препарата сравнения. Средний показатель pH вагинального секрета у самок крыс не снижался ниже 5,83 и статистически достоверно отличался от показателя у нелеченных животных. Таким образом, данный вагинальный гель способствовал снижению pH до показателя, который характеризовал среду вагинального секрета как слабо-кислую, и

незначительно уступал при этом суппозиториям с Э.

С целью предотвращения дегенеративных изменений в генитальном тракте представляло интерес изучить влияние исследуемых тест-образцов на микроструктуру вагины и матки самок крыс с гипоестрогенией.

Структурная организация вагины самок группы ИК соответствовала физиологической норме: эпителиальная выстилка, собственная пластинка слизистой (строма) и подслизистая соединительнотканная основа. В дистальном отделе вагины эпителий многослойный плоский, с разным по выраженности ороговением. В проксимальном отделе он приобретал структуру многослойного плоского, окаймленного призматическим. В нем четко дифференцировались базальный, промежуточный и функциональный (ряды слизеобразующих клеток) слои (рисунок 3 а). Эпителиальный пласт состоял из 10–15 ря-

дов клеток в зависимости от фазы эстрального цикла (Prooestrus-Oestrus). Цитоплазма клеток промежуточного и функционального слоев была богата гликогеном (рисунок 3 б). Таким эпителием выстлана большая часть вагины. Строма слизистой представлена довольно плотной соединительной тканью,

ближе к мышечному слою переходящую в рыхлую волокнистую ткань подслизистой основы слизистой. Строма и подслизистая основа умеренно васкуляризованы, клеточно насыщены. Эндотелиальная выстилка кровеносных сосудов не изменена, просвет сосудов свободный.

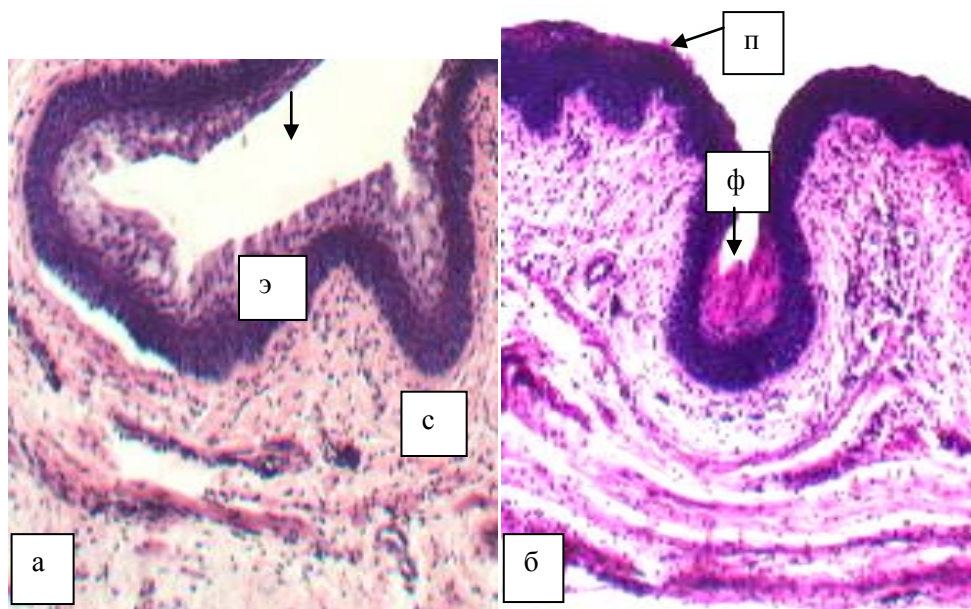


Рисунок 3. – Проксимальный отдел вагины животных группы интактного контроля. Фаза Prooestrus эстрального цикла (а – широкий пласт эпителиальной выстилки (э) с четким делением на базальный, промежуточный и функциональный (стрелка) слои, умеренная васкуляризация стромы (с). Гематоксилин-эозин; б – гликоген в клетках промежуточного (п) и функционального (ф) слоев. ШИК-реакция). Ув. х250

Микроскопия матки животных этой группы показала, что на срезах визуализировались три оболочки: эндометрий (слизистая), миометрий (мышечная) и серозная. Гистоструктура их соответствовала физиологической норме [25]. Поверхность эндометрия выстлана однослойным высококубическим или цилиндрическим эпителием. Апикальный контур клеток четкий, ядра расположены на одном уровне. Среди клеток эпителия просматривались немногочисленные большие пузырчатые клетки, прилежащие к базальной мембране. Эпителий был четко отделен от широкого слоя собственной пластинки слизистой, содержащей большое количество фибробластических клеток, маточных желез, расположенных на разных уровнях, разнонаправленных, умеренных по толщине коллагеновых волокон. Поперечные профили сосудов (спиральных артерий и капилляров) были многочисленными,

полнокровными, с широким просветом, расположены как одиночно, так и приближены друг к другу (рисунок 4 а). Миометрий представлен пучками гладкомышечных волокон, разделенными тонкими соединительнотканными прослойками. Пучки имели циркулярное (внутренний подслизистый слой) и поперечное (наружный надсосудистый слой) направление. Разнонаправленные слои мышечных волокон разделял сосудистый слой. На разных участках маточного рога толщина его выраженно колеблется в зависимости от представленных полнокровных артерий разного калибра (рисунок 4 б). При постановке ШИК-реакции цитоплазма эпителиальных клеток, выстилающих поверхность слизистой, равномерно и густо окрашивалась, что свидетельствовало о накоплении в них гликогена (рисунок 4 б). Эпителий маточных желез ШИК-позитивных веществ не содержал.

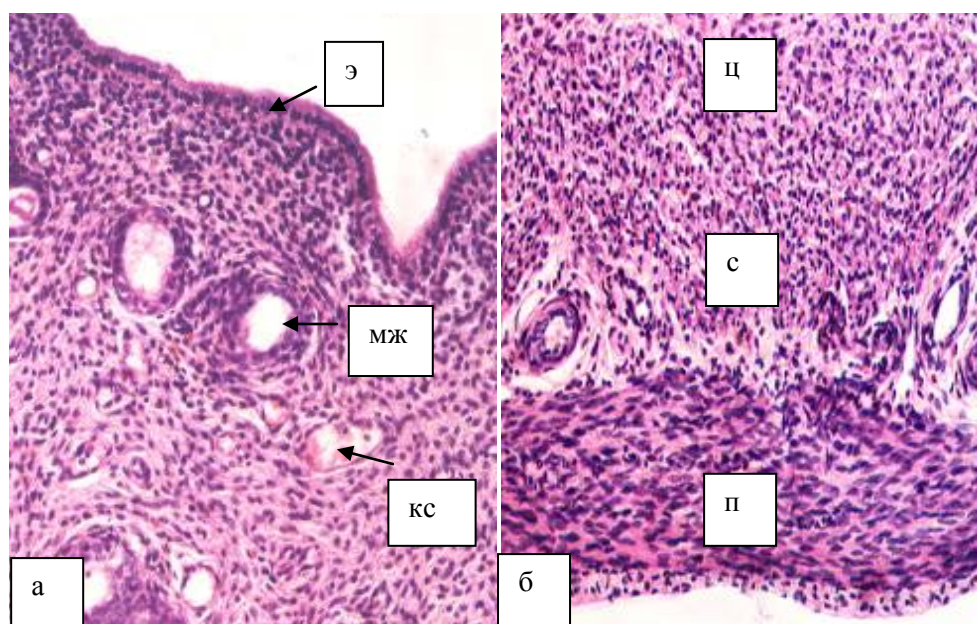


Рисунок 4. – Эндометрий (а – однослойный цилиндрический эпителий (э), строма, богатая клеточным материалом, маточными железами (мж) и тонкостенными кровеносными сосудами (кс)) и миометрий (б – циркулярный (ц), продольный (п) и сосудистый (с) слои) рога матки животных группы интактного контроля. Гематоксилин и эозин. Ув. х250

После билатеральной овариэктомии в слизистой оболочке вагины наблюдались выраженные изменения: стенка была истончена, атрофична. Эпителий по всей длине имел сходное строение. Толщина эпителиального слоя не превышала 3-4 рядов клеток. Сами клетки уменьшены в разме-

ре, не содержали гликогена, объем клеток практически полностью был занят ядром. Морфологическая картина похожа на фазу эстрального цикла Dioestrus. Отмечалось уменьшение клеточности и васкуляризации стромы. Часть кровеносных сосудов находилась в состоянии спазма (рисунок 5).

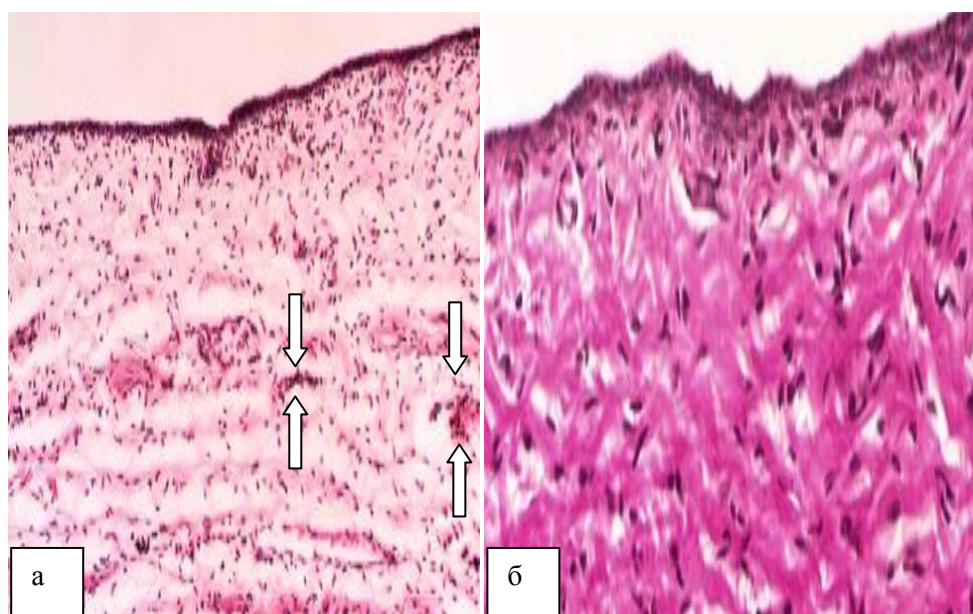


Рисунок 5. – Проксимальный отдел слизистой оболочки вагины самки после овариэктомии. Выраженное истончение эпителиальной выстилки, спазм (стрелки) кровеносных сосудов (а – гематоксилин и эозин. Ув. х200); отсутствие гликогена в клетках эпителия (б – ШИК-реакция. Ув. х250)

Выраженная атрофия отмечалась и в рогах матки животных группы КП. Изменения касались как эндометрия, так и миометрия. В эндометрии выстилающие поверхность эпителиальные клетки становились низкокубическими, иногда уплощенными, ядра занимали весь объем клетки, гликоген отсутствовал. Отмечалось снижение клеточной насыщенности стромы, особенно в подэпителиальных участках. Клетки стромы в основном малодифференцированы, фибробластоподобны. Сосудистая сетка была скудной, большинство из оставшихся спиральных артерий и капилляров нахо-

дились в спазмированном состоянии. Маточные железы немногочисленны, как правило, размер и просвет их был уменьшен. Эпителий желез также уменьшен в размере, местами неравномерно пролиферировал, сами клетки не типично размещены в выстилке (вертикально). Мышечные слои миометрия были тонкими, в сосудистом слое практически все сосуды мелкого и среднего калибра находились в состоянии спазма, стенка их утолщена (рисунок 6). Подобное состояние сосудистой стенки является одним из морфологических проявлений эндотелиальной дисфункции.

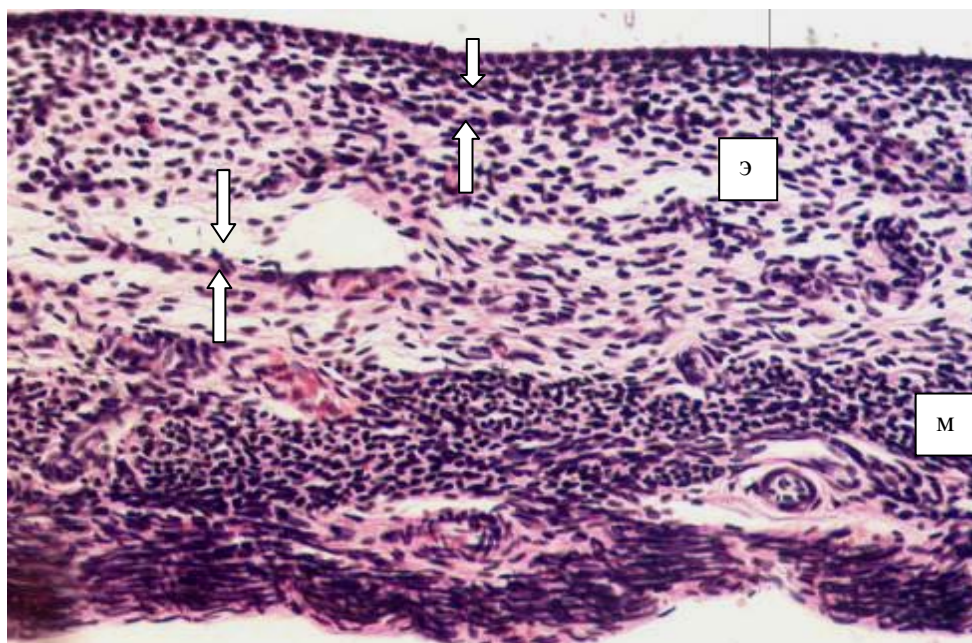


Рисунок 6. – Эндометрий (э) и миометрий (м) рога матки самки после овариэктомии. Выраженное уменьшение размера поверхностных эпителиальных клеток, численности маточных желез, обеднение сосудистой сети, спазм спиральных мелких артерий (между стрелками); истончение мышечных слоев. Гематоксилин и эозин. Ув. x250.

У животных, которых лечили препаратом сравнения, отмечено полное восстановление структуры слизистой оболочки вагины (рисунок 7), а также эндометрия и миометрия рогов матки. Состояние железистых и стромальных клеток, кровеносных сосудов не отличалось от таковых у самок группы ИК (рисунок 8).

У всех животных, которым вводили тест-образец №1, не наблюдали изменений состояния вагинального эпителия в сравнении с группой КП. Он оставался тонким, сосочковые разрастания были незначительными. Собственная пластинка слизистой визуально была намного меньше по объему, чем у интактных жи-

вотных (рисунок 9 а). Однако следует отметить, что увеличивалась васкуляризация слизистой оболочки и подслизистой основы. Сосудистые стенки были с неплохим тонусом, сами сосуды были полнокровны, с нормальным просветом (рисунок 9 б).

После курсового интравагинального введения тест-образца №1 стенка рогов матки животных также оставалась значительно истонченной, однако эпителиальные клетки, выстилающие поверхность эндометрия, были не низкими кубическими (как у КП), а кубической формы. Местами прослежено появление высококубических клеток с просветленной цитоплазмой,

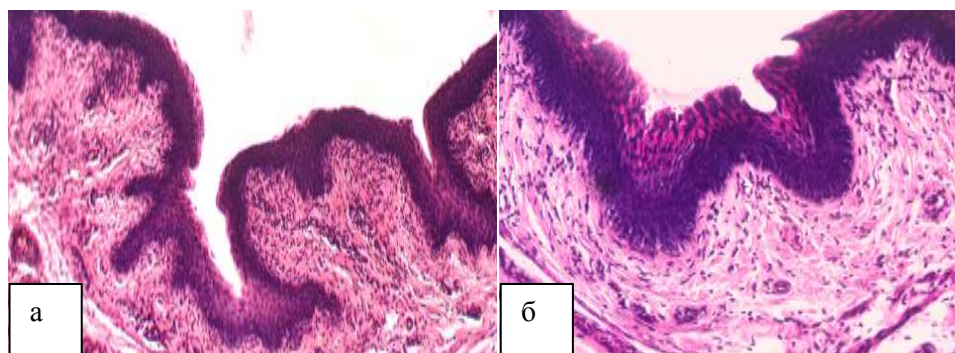


Рисунок 7. – Проксимальный отдел вагины овариэктомированной самки крысы после лечения препаратом сравнения. Состояние эпителия соответствует фазе Prooestrus эстрального цикла: а – гематоксилин и эозин. Ув. x100; б – ШИК-реакция. Ув. x200.

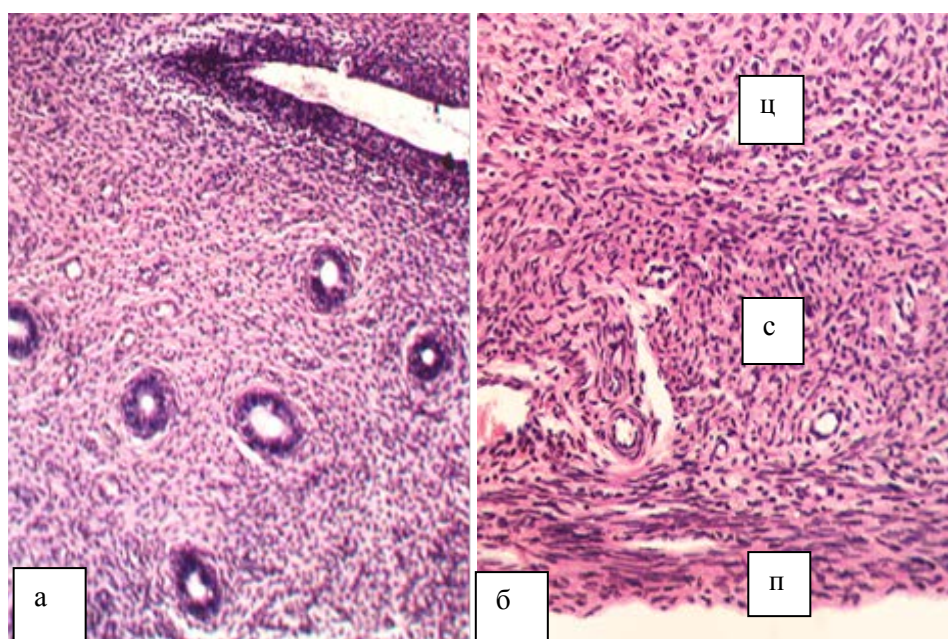


Рисунок 8. – Эндометрий (а) и миометрий (б) рога матки овариэктомированной самки крысы после лечения препаратом сравнения. Состояние эпителия соответствует фазе Prooestrus эстрального цикла. Восстановление состояния маточных желез, кровеносных сосудов, ширины мышечных (ц, п) и сосудистого (с) слоев. Гематоксилин и эозин. Ув. x200.

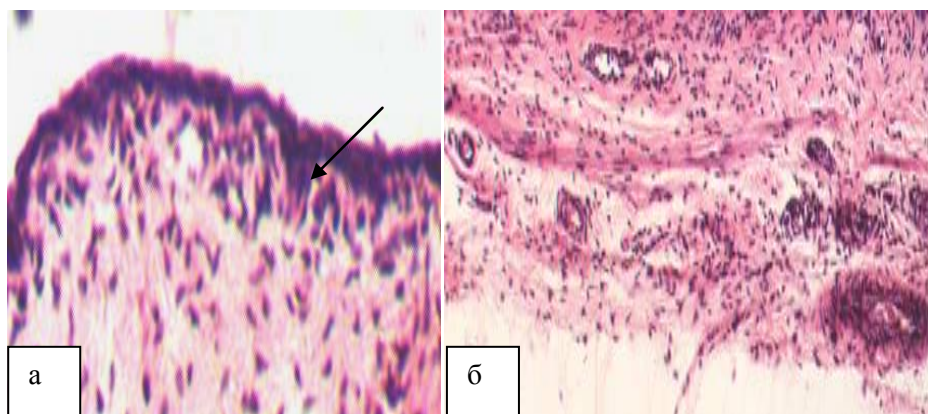


Рисунок 9. – Проксимальный отдел вагины овариэктомированной самки крысы после лечения тест-образцом №1 (а – эпителиальный пласт тонкий. Ув. x250; б – улучшение кровоснабжения стромы. Ув. x200). Гематоксилин и эозин.

центрально расположенным ядром и четкой надъядерной зоной. На некоторых участках эпителиальные клетки умеренно пролиферировали, образуя несколько рядов. Численность маточных желез не увеличивалась, но длина и извитость, просвет самих желез, высота выстилающих их эпителиальных клеток были заметно уве-

личены, что, возможно, связано с повышением функциональной активности их по сравнению с группой КП. Мышечные слои миометрия не восстанавливались по толщине, но кровоснабжение улучшалось – в сосудистом слое кровеносные сосуды разного калибра были менее спазмированы (рисунок 10).

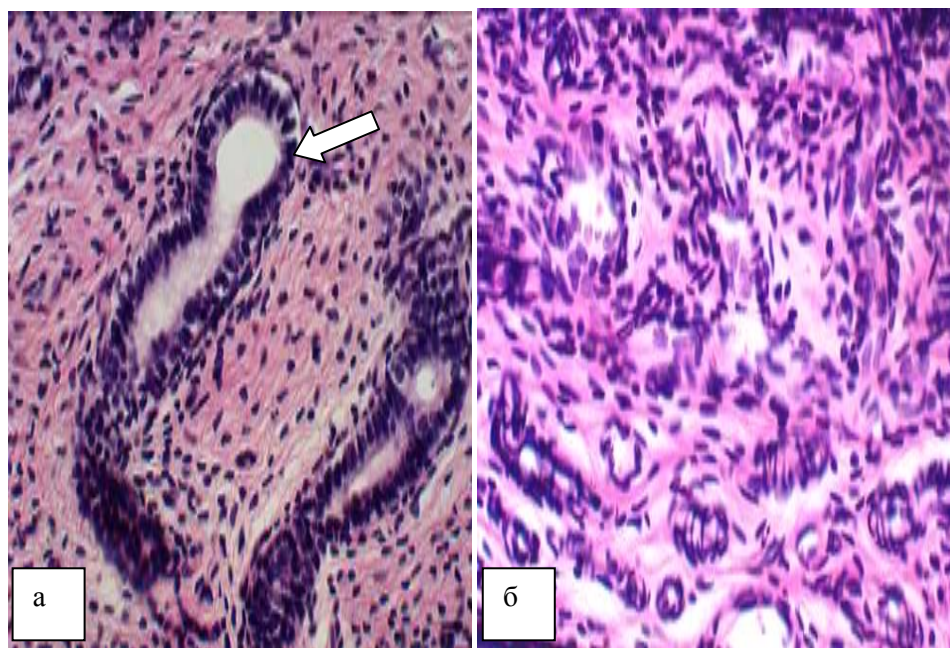


Рисунок 10. – Эндометрий (а) и сосудистый слой миометрия (б) рога матки овариэктомированной самки крысы после лечения тест-образцом №1: а – увеличение высоты эпителиальных клеток, выстилающих маточные железы. Ув. x200; отсутствие спазма кровеносных сосудов. Гематоксилин и эозин. Ув. x250.

Под влиянием тест-образца №2 эпителиальный пласт в разных отделах вагины был выражено увеличен в сравнении с кастрированными животными. Структура эпителия в проксимальном отделе очень похожа на таковую в фазе Prooestrus (в разных фазах) – эпителий имеет отчетливое трехзональное строение, в цитоплазме клеток промежуточного и функционального слоев был обнаружен гликоген – примерно середина фазы (рисунок 11 а); клетки функционального слоя были разрыхлены, слущивались целыми группами. Среди клеток было умеренное количество лейкоцитов – характерное для конца стадии Prooestrus (рисунок 11 б). В собственной пластинке слизистой было увеличено кровоснабжение.

Стенка рогов матки самок после лечения тест-образцом №2 была значительно утолщена по сравнению с кастрированными

животными. Эпителиальные поверхностные клетки по размеру сопоставимы с таковыми в группе животных ИК, цитоплазма их была богата гликогеном. Среди эпителиальных клеток обнаруживались светлые пузырьковидные клетки. В строме было выражено увеличено количество кровеносных капилляров. Количество маточных желез и состояние эпителия их варьировало у разных самок (рисунок 12 а). В миометрии все слои были увеличены в размере, кровеносные сосуды сосудистого слоя не были спазмированы (рисунок 12 б).

Таким образом, недостаток эндогенных эстрогенов привел к инволютивным изменениям в половых органах самок крыс. Препарат сравнения полностью восстанавливал гистоструктуру вагины и рогов матки. Курсовое введение тест-образца №1 не оказывало типичного эстрогеноподобного влияния, как суппозитории с Э [37].

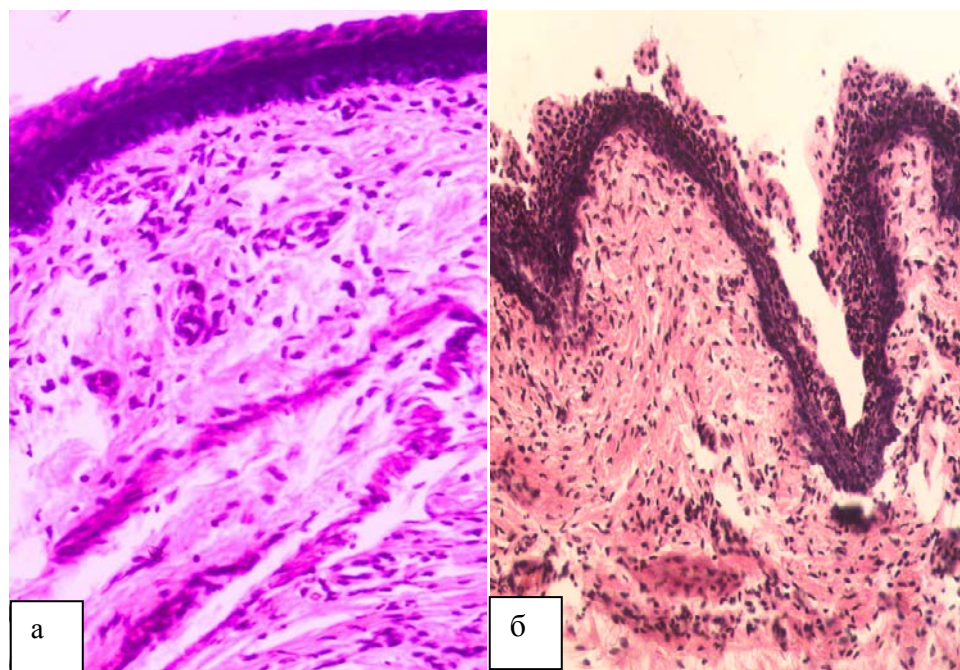


Рисунок 11. – Проксимальный отдел вагины овариэктомированной самки крысы после лечения тест-образцом №2. Фаза Prooestrus эстрального цикла: а – середина фазы – трехзональная структура эпителия, гликоген в клетках промежуточного и функционального слоев (ШИК-реакция); б – более поздний этап фазы - разрыхление и сдушивание клеток функционального слоя (гематоксилин и эозин). Ув. x200.

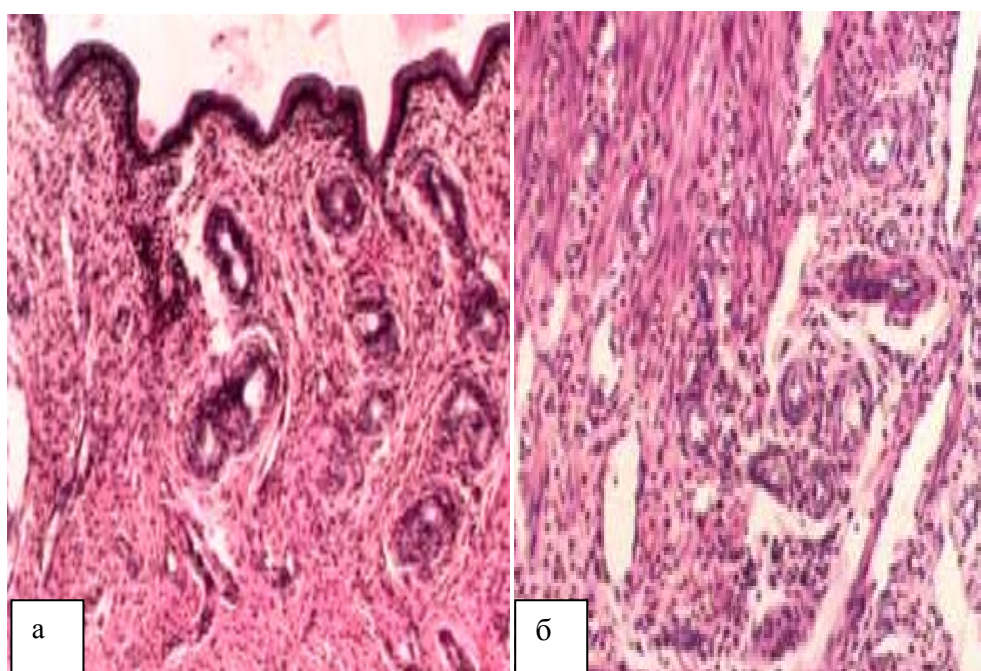


Рисунок 12. – Эндометрий (а – нормализация состояния эпителиальной выстилки и маточных желез) и сосудистый слой миометрия (б – нормальное (физиологическое) состояние кровеносных сосудов) рога матки овариэктомированной самки после лечения тест-образцом №2. Гематоксилин и эозин. Ув. x200.

Однако при сохранении признаков атрофии слизистой оболочки вагины (истончение поверхностного эпителия, уменьшение объема стромы и мышечных слоев) отсутствовал спазм сосудов и увеличивалась васкуляризация. Курсовое введение тест-образца №2 более выраженно устраняло атрофические изменения в вагине и рогах матки и его действие приближалось к действию препарату сравнения. Полученные нами данные свидетельствуют об эффективности использования тест-образца №2 с целью фармакологической коррекции расстройств генитального тракта при гипозэстрогеновых состояниях разного генеза и в период менопаузы [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Гипозэстрогения у самок крыс после билатеральной овариэктомии сопровождалась выраженными нарушениями со стороны генитального тракта.

2. Курсовое 28-дневное вагинальное введение крем-геля с 5% глюкозамина гидрохлоридом в дозе 22,7 мг/кг овариэктомизированным самкам крыс приводило к восстановлению физиологического диапазона значений показателя кислотности вагинального секрета (показатель pH снижался в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с КП); увеличению популяции лактобактерий ($p < 0,05$), достоверному снижению количества стафилококков, кишечной палочки и др. аэробных грамотрицательных микроорганизмов; уменьшению признаков эндотелиальной дисфункции в сосудах вагины.

3. Курсовое 28-дневное вагинальное введение геля с экстрактом хмеля и аскорбиновой кислотой в дозе 0,06 мг/кг овариэктомизированным самкам крыс способствовало статистически достоверному уменьшению условно-патогенных микроорганизмов и общего количества анаэробов, увеличению числа колоний лактобактерий до уровня здоровых животных, нормализации водородного показателя вагинального секрета (соответствовал данным животных группы ИК); предотвращению атрофических изменений в микроскопической организации слизистой оболочки вагины и матки, возобновлению накопления гликогена клетками эпителия.

4. По сумме исследуемых показателей наибольшую эффективность оказывал пре-

парат сравнения – суппозитории с эстриолом. Однако по способности уменьшать показатели количества аэробных грамотрицательных бактерий, стафилококков и возобновлять численность лактобактерий действие тест-образца №2 превосходило препарат сравнения.

5. Учитывая многогранность биологических и фармакологических эффектов исследуемых тест-образцов открываются перспективы их использования в комбинации с другими лекарственными средствами с целью фармакологической коррекции расстройств генитального тракта (атрофии, сухости, зуда, диспареунии) при гипозэстрогеновых состояниях разного генеза и в период менопаузы.

SUMMARY

O. S. Sinitsyna, I. M. Ryzhenko,
A. V. Zaychenko, Yu. B. Laryanovskaya
COMPARATIVE EVALUATION
OF THE NEW VAGINAL GEL EFFECT
ON THE GENITAL TRACT CONDITION
OF SPAYED FEMALE RATS

The effectiveness of new vaginal gels action containing glucosamine hydrochloride (test sample No. 1) and hop extract (test sample No. 2) on the condition of the genital tract of spayed female rats has been established. The therapeutic effect of the vaginal gels studied and the reference preparation - suppositories "Ovestin" has been evaluated based on microbiological study of the vaginal secretion, pH value determination of the vaginal environment, morphological study of the vagina tissues and the uterus of spayed female rats. It has been shown that the course administration of the test sample No. 1 to the animals has had a positive effect on the parameters studied and the test-sample No. 2 has shown a greater activity compared to it. By the ability to increase the population of lactobacilli, test sample No. 2 has exceeded the activity of the comparator. The test samples tested are promising for further study in order to use them in combination with other drugs for menopausal hormone therapy in women with estrogen deficiency and during menopause.

Keywords: spayed female rats, estrogen deficiency, genital tract, phytoestrogens, vaginal gel with hop extract, vaginal cream-gel with glucosamine hydrochloride.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косілова, С. Е. Негормональна корекція клімактеричних розладів у жінок у постменопаузі / С. Е. Косілова // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т. 19, № 2. – С. 113–115.
2. Estrogen receptor (ER) and ER-related receptor expression in normal and atrophic human vagina / A. Cavallini [et al.] // *Maturitas*. – 2008. – Vol. 59, № 3. – С. 219–225.
3. Есефидзе, Ж. Т. Клиника, диагностика и лечение атрофического вагинита в постменопаузе / Ж. Т. Есефидзе // *РМЖ*. – 2001. – Т. 9, № 9. – С. 370–373.
4. Tommasen, N. V. Impact of chronic disease or quality of life in the Bella Coala Valley / N. V. Tommasen, W. Zhag // *Rural Remote Health*. – 2006. – Vol. 6, № 2. – С. 528–530.
5. Балан, В. Е. Вагинальная атрофия в климактерии / В. Е. Балан // *Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии*. – 2009. – № 3. – С. 44–47.
6. The antimicrobial defense mechanism of the female urethra: a reassessment / C. M. Kunin [et al.] // *J. Urol.* – 2002. – Vol. 168, № 2. – P. 413–419.
7. Effectiveness of estriol-containing vaginal pessaries and nitrofurantoin macrocrystal therapy in the prevention of recurrent urinary tract infection in postmenopausal women / R. Raz [et al.] // *Clin. infectious diseases*. – 2003. – Vol. 36, № 11. – P. 1362–1368.
8. Cruickshank R. The biology of the vagina in the human subject / R. Cruickshank, A. Sharman // *BJOG: An Int. J. Obs. & Gyn.* – 1934. – Vol. 41, № 2. – P. 208–226.
9. Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment / G. B. Melis [et al.] // *Minerva ginecologica*. – 2000. – Vol. 52, № 4. – P. 111–121.
10. Danielsson, D. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis / D. Danielsson, P. K. Teigen, H. Moi // *Ann. the New York Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 1230, № 1. – P. 48–58.
11. Микроэкология влагалища. Микробиоценоз в норме, при патологических состояниях и способы его коррекции: лекция / Л. И. Кафарская [и др.]. – М., 2005. – С. 1–5.
12. Witkin, S. S. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation / S. S. Witkin, I. M. Linhares, P. Giraldo // *Best Practice & Research Clin Obstetrics & Gynaecology*. – 2007. – Vol. 21, № 3. – С. 347–354.
13. Free glycogen in vaginal fluids is associated with *Lactobacillus* colonization and low vaginal pH / P. Mirmonsef [et al.] // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9, № 7. – С. e102467.
14. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women / S. Cauci [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40, № 6. – P. 2147–2152.
15. Доброхотова, Ю. Э. Современные представления о механизмах развития дисбиоза влагалища / Ю. Э. Доброхотова, Н. Г. Затицян // *Акушерство, гинекология и репродукция*. – 2008. – № 1. – С. 3–6.
16. Ziagham, S. Effect of hyaluronic acid and vitamin E vaginal tablets on atrophic vaginitis: A randomized controlled trial / S. Ziagham, Z. Abbaspoor, M. R. Abbaspour // *Afr. J. Pharm. Pharmac.* – 2012. – Vol. 6, № 45. – P. 3124–3129.
17. Erkkola, R. Стандартизованный экстракт хмеля в облегчении симптомов менопаузы / R. Erkkola, S. Vervarcke // *Репродукт. эндокринолог.* – 2011. – № 2. – С. 72–78.
18. Зузук, Б. М. Хмель выюющийся (син. хмель обыкновенный) / Б. М. Зузук, Р. В. Куцик // *Провизор* – 2004. – № 13. – С. 13–14.
19. Salamonsen, L. A. Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle: implications for implantation and menstruation / L. A. Salamonsen, S. Shuster, R. Stern // *Cell. Tissue Res.* – 2001. – Vol. 306. – P. 335–340.
20. Вплив аміноцукру D-глюкозаміну на рівень статевих гормонів у щурів / Г. В. Зайченко [та ін.] // *Проблеми ендокринної патології*. – 2008. – № 1. – С. 70–75.
21. Зупанец И. А. Экспериментальное обоснование использования глюкозамина и его производных в медицине : дис. ... докт. мед. наук (в форме научного доклада) / И. А. Зупанец. – Купавна, 1993. – 90 с.
22. Киршенблат, Я. Д. Практикум по эндокринологии / Я. Д. Киршенблат. – М., 1969. – С. 55–57.
23. Рыболовлев, Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // *Доклады АН СССР*. – 1979. – № 6. – С. 1513–1516.

24. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. рекомендації / Ю. Л. Волянський [та ін.]. – К., 2004. – 38 с.

25. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов – М. : Медицина, 1969. – 423 с.

26. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2001. – 408 с.

27. Халафян, А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / А. А. Халафян. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.

28. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін [та ін.]. – Київ, Видавн. дім «Авіцена» – 2002. – 156 с.

29. Sugar expressions on the vaginal epithelium in pregnant mice / Y. Yasunaga [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2012, Jun. – 74 (6). – P. 805–808.

30. Местная терапия урогенитальных нарушений в пери- и постменопаузе / Т. В. Овсянникова [и др.] // Акуш. гинекол. репр. – 2010. – Т. 4, № 3. – С. 25–28.

31. Дубоссарская, З. М. Особенности биотопа влагалища при урогенитальных расстройствах у женщин в постменопаузе / З. М. Дубоссарская, Ю. А. Дубоссарская // Репродукт. здоровье женщ. – 2007. – Т. 32, № 3. – С. 1–3.

32. Балан, В. Е. Клиническая картина, диагностика и лечение вагинальной атрофии в климактерии / В. Е. Балан // Гинекология. – 2009. – Т. 2, № 11. – С. 26–29.

33. Кира, Е. Ф. Микроэкология влагалища / Е. Ф. Кира // Механизмы стабильности и методы коррекции. – 2014. – Т. 31,

№ 11. – С. 75–81.

34. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification / E. R. Boskey [et al.] // Infect Immun. – 1999. – Vol. 67, № 10. – P. 5170–5175.

35. S–equol a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora / K. D. Setchell [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 81, № 5. – P. 1072–1079.

36. Цизина, Е. А. Нормоценоз влагалища и его влияние на здоровье женщин / Е. А. Цизина, Н. А. Ильина // Молодой ученый. – 2011. – Т. 2, № 8. – С. 152–156.

37. Sinitsyna, O. S. Influence of vaginal administration of glucosamine hydrochloride to psycho-emotional and locomotor activity of spay female rats / O. S. Sinitsyna, G. V. Zaychenko, I. M. Ryzhenko // Eureka: Health sciences. – 2016. – № 2 (2). – P. 43–48.

38. Редукция симптомов гипоестрогении у овариэктомированных крыс под влиянием вагинального геля с экстрактом шишек хмеля / О. С. Сеницына [и др.] // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 6. – С. 20–24.

Адрес для корреспонденции:

61001, Украина,
г. Харьков, площадь Защитников Украины, 17,
Институт повышения квалификации
специалистов фармации
Национального фармацевтического
университета,
тел. (0577) 732-89-53,
e-mail: clinpharmacol_ipksph@nuph.edu.ua,
Сеницына О. С.

Поступила 26.03.2018 г.